

PCT

09/913858
00/00040

REC'D 27 MARS 2000

WIPO

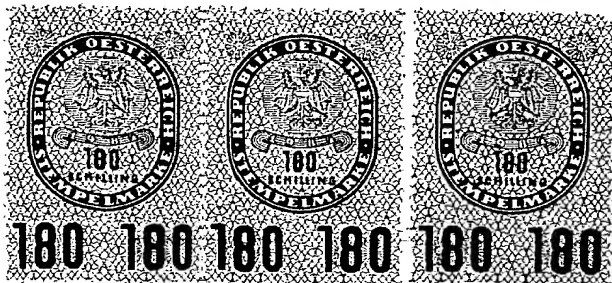
PCT



4

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10



AT00/40

Aktenzeichen A 270/99

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

Dr. Friedrich Altmann
Institut für Chemie Universität für Bodenkultur
in A-1190 Wien, Muthgasse 18,

am **18. Feber 1999** eine Patentanmeldung betreffend**"Fucosyltransferase-Gen",**

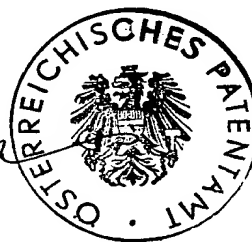
überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 25. Februar 2000

Der Präsident:

i. A.



HRNCIR
Fachoberinspektor

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

A 270/99-1

AT PATENTSCHRIFT

11 Nr.

73 Patentinhaber: Altmann Friedrich, Dr.
Wien (AT)

54 Gegenstand: Fucosyltransferase-Gen

61 Zusatz zu Patent Nr.

62 Ausscheidung aus:

22 21 Angemeldet am: 18. Feb. 1999

33 32 31 Unionspriorität:

42 Beginn der Patentdauer:
Längste mögliche Dauer:

45 Ausgegeben am:

72 Erfinder:

60 Abhängigkeit:

56 Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

Strukturen werden auch komplexe N-Glykane bzw. Mannose defiziente oder trunkierte N-Glykane genannt. Die α -Mannosylreste können weiters durch GlcNAc ersetzt werden, an die Galaktose und Fucose gebunden sind, so daß eine Struktur hergestellt wird, die dem humanen Lewis a Epitop entspricht (Melo et al. 1997, FEBS Lett. 415, 186-191; Fitchette-Laine et al. 1997 Plant J. 12, 1411-1417).

Weder die Xylose noch die α 1,3-gebundene Fucose kommen in Säugerglykoproteinen vor. Es stellte sich heraus, daß die Core- α 1,3-Fucose eine wichtige Rolle in der Epitoperkennung von Antikörpern spielt, die gegen pflanzliche und Insekten-N-gebundene Oligosaccharide gerichtet sind (I.B.H. Wilson et al., Glycobiology Vol. 8, Nr. 7, S. 651-661, 1998) und dadurch Immunreaktionen im menschlichen oder tierischen Körper gegen diese Oligosaccharide auslösen. Der α 1,3-Fucoserest scheint weiters eine der Hauptursachen für die weit verbreitete allergische Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen pflanzlichen und Insekten-Allergenen zu sein (Tretter et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 1993; 102:259-266) und wird auch "kreuzreaktive Kohlenhydrat Determinante" (CCD) genannt. Bei einer Studie von Epitopen von Tomaten und Graspollen wurden ebenfalls α 1,3-gebundene Fucoseresten als gemeinsame Determinante festgestellt, was der Grund für das häufige gemeinsame Auftreten von Tomaten- und Graspollenallergien in Patienten zu sein scheint (Petersen et al. 1996, J. Allergy Clin. Immunol., Vol 98, 4; 805-814). Die CCDs verschleiern weiters durch das häufige Auftreten von immunologischen Kreuzreaktionen Allergie-Diagnosen.

Diese immunologischen Reaktionen, die von pflanzlichen Proteinen im menschlichen Körper ausgelöst werden, ist das Hauptproblem bei der medizinischen Verwendung von in Pflanzen produzierten, rekombinanten menschlichen Proteinen. Um dieses Problem zu umgehen, müßte die α 1,3 Core-Fucosylierung verhindert werden. Es konnte in einer Studien gezeigt werden, daß Oligosaccharide, die anstelle einer L-Fucose (6-Deoxy-L-Galaktose) eine L-Galaktose aufweisen, dennoch voll biologisch aktiv sind (E. Zablackis et al. 1996, Science, Vol 272). Gemäß einer anderen Studie wurde eine Mutante der Pflanze Arabidopsis thaliana isoliert, dem die N-Acetyl-Glucosaminyl-Transferase I fehlt, das erste Enzym in der Biosynthese von komplexen Glykanen. Die

kationsnummer 1 codiert für ein Protein mit 510 Aminosäuren und mit einem theoretischen Molekulargewicht von 56,8 kDa, wobei im Bereich zwischen Asn36 und Gly54 vermutlich ein transmembranes Stück vorliegt. Der errechnete pI-Wert des codierten Proteins der Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 beträgt 7,51.

Die Aktivität der pflanzlichen Fucosyltransferase wird durch ein Verfahren nachgewiesen und gemessen, wobei die Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend markierte Fucose und einen an einen Träger, z.B. Sepharose, gebundenen Akzeptor (z.B. ein Glykoprotein) zugesetzt wird. Nach der Reaktionszeit wird die Probe gewaschen und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird dabei als positiv angesehen, wenn die Aktivitätsmessung zumindest um 10 bis 20%, insbesondere zumindest um 30 bis 50% höher liegt als die Aktivitätsmessung der Negativkontrolle. Die Struktur des Glykoproteins kann zusätzlich mittels HPLC verifiziert werden. Solche Protokolle sind Stand der Technik (Staudacher et al. 1998, Anal. Biochem. 246, 96-101; Staudacher et al. 1991, Eur.J. Biochem. 199, 745-751).

Beispielsweise wird Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend radioaktiv markierter Fucose und einen Akzeptor, z.B. GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, zugesetzt. Nach Reaktionszeit wird die Probe durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Aus der Differenz der gemessenen Radioaktivität der Probe mit Akzeptor und der einer Negativkontrolle ohne Akzeptor kann die Aktivität errechnet werden. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird bereits als positiv gewertet, wenn die gemessene Radioaktivität zumindest um 30-40% höher liegt als die gemessene Radioaktivität der Negativprobe.

Die Paarung von zwei DNA-Molekülen kann durch die Wahl der Temperatur und Ionenstärke der Probe verändert werden. Unter stringenten Bedingungen, werden erfindungsgemäß Bedingungen verstanden, die eine exakte, stringente, Bindung ermöglichen. Z.B. werden die DNA-Moleküle in 7% Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), 0,5M NaPO₄ pH 7,0; 1mM EDTA bei 50°C hybridisiert und mit 1% SDS bei 42°C gewaschen.

Ob Sequenzen eine zumindest 50% Homologie zur Sequenz-

dingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA Sequenz degeneriert ist. Die Homologie wird vorzugsweise mit einem Programm bestimmt, das Insertionen und Deletionen erkennt und diese nicht in der Homologie-Berechnung berücksichtigt. Diese Nukleotidsequenz codiert für ein konserviertes Peptid-Motiv, d.h. daß die Mehrheit der aktiven und funktionierenden GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen die dadurch codierte Aminosäuresequenz umfaßt. Die Sequenz kann dabei sowohl die gleiche Größe wie die Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 3 aufweisen, oder aber selbstverständlich auch größer sein.

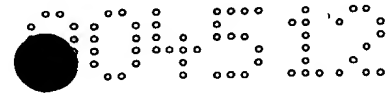
Die Sequenz-Identifikationsnummer 3 weist folgende Sequenz auf:

5'-gaagccctgaagcactacaaatttagcttagcggttgaaaattcgaatgaggaag
attatgtaactgaaaaattcttccaatcccttggtgctggaactgtccct -3'

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein DNA-Molekül, das eine Teilsequenz eines der oben genannten DNA-Moleküle umfaßt und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist. Das DNA-Molekül kann beispielsweise dazu eingesetzt werden, als Sonde an komplementäre Sequenzen von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen zu binden, so daß diese aus einer Probe selektiert werden können. Auf diese Weise können weitere GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen aus den verschiedensten Pflanzen und Insekten selektiert, isoliert und charakterisiert werden. Es können jede beliebige oder auch mehrere verschiedene Teilsequenzen verwendet werden, insbesondere ein Teil des oben schon beschriebenen konservierten Motivs.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn eines der oben genannten DNA-Moleküle kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist. Als Markierungssubstanz kommt jeder gebräuchliche Marker in Frage, so z.B. fluoreszierende, luminiszierende, radioaktive Marker, nicht-isotope Markierungen, wie Biotin, etc. Dadurch werden Reagenzien bereitgestellt, die für den Nachweis, die Selektion und Quantifizierung von entsprechenden DNA-Molekülen in festen Gewebeproben (z.B. von Pflanzen) oder auch in Flüssigkeitsproben durch Hybridisierungsverfahren nützlich sind.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der oben genannten DNA-Moleküle



len Vektor, der ein DNA-Molekül gemäß einem der oben beschriebenen Ausführungsformen oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfaßt. Wird dieser Vektor in eine Wirtszelle tranfektiert, wird eine "Antisense-mRNA" abgelesen, die komplementär zur mRNA der GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase ist und diese komplexiert. Diese Bindung behindert entweder die korrekte Prozessierung, den Transport, die Stabilität, oder durch Verhinderung der Ribosomenanlagerung die Translation und damit die normale Genexpression der GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase.

Obwohl die gesamte Sequenz des DNA-Moleküls in den Vektor eingebaut werden könnte, können Teilsequenzen davon aufgrund der geringeren Größe für bestimmte Zwecke vorteilhafter sein. Wichtig ist z.B. beim Antisense-Aspekt, daß das DNA-Molekül groß genug ist, um eine ausreichend große Antisense-mRNA zu bilden, die an die Transferase-mRNA bindet. Beispielsweise umfaßt ein geeignetes Antisense-RNA-Molekül 50 bis 200 Nukleotide, da viele der bekannten natürlich vorkommenden Antisense-RNA-Molekülen etwa 100 Nukleotide umfassen.

Für eine besonders effektive Inhibierung der Expression einer aktiven α 1,3-Fucosyltransferase ist eine Kombination der Sense-Technik und Antisense-Technik geeignet (Waterhouse et al. 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:13959-13964).

Vorteilhafterweise werden schnell hybridisierende RNA-Moleküle eingesetzt. Die Effizienz von Antisense-RNA-Molekülen, die eine Größe von über 50 Nukleotiden aufweisen, hängt von der Anlagerungskinetik in vitro ab. So zeigen z.B. schnell anlagernde Antisense-RNA-Moleküle eine stärkere Inhibition der Proteinexprimierung als langsam hybridisierende RNA-Moleküle (Wagner et al. 1994, Annu. Rev. Microbiol., 48:713-742; Rittner et al. 1993, Nucl. Acids Res, 21:1381-1387). Solche schnell hybridisierenden Antisense-RNA-Moleküle weisen insbesondere eine große Anzahl von externen Basen (freie Enden und Verbindungssequenzen), eine große Anzahl von strukturellen Subdomänen (Komponenten), sowie einen geringen Grad an Schleifen (Patzel et al. 1998; Nature Biotechnology, 16; 64-68) auf. Die hypothetischen Sekundärstrukturen des Antisense-RNA-Moleküls können z.B. mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt werden, nach dem eine geeignete Antisense-RNA DNA-Sequenz ausgesucht wird.

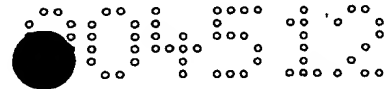
mRNA hergestellt werden, selbst wenn nicht die gesamte DNA-Sequenz, die für das Protein codiert, bekannt ist. Ribozyme sind besonders dann effizient, wenn die Ribosomen langsam an der mRNA entlang gleiten. In diesem Fall ist es für das Ribozym leichter, eine Ribosomen-freie Stelle an der mRNA zu finden. Aus diesem Grund sind langsame Ribosomen-Mutante als System für Ribozyme ebenfalls geeignet (J.Burke, 1997, Nature Biotechnology; 15, 414-415)

Eine Möglichkeit besteht auch darin, eine abgewandelte Form eines Ribozyms einzusetzen, nämlich ein Minizym. Insbesondere für das Schneiden von größeren mRNA-Molekülen sind Minizyme effizient. Ein Minizym ist ein Hammerkopf-Ribozym, das anstelle der Stem/Loop II einen kurzen Oligonukleotid-Linker aufweist. Besonders effizient sind Dimer-Minizyme (Kuwabara et al. 1998, Nature Biotechnology, 16; 961-965).

Demnach betrifft die Erfindung ebenfalls einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der beiden zuletztgenannten DNA-Moleküle (Mutations oder Ribozym-DNA-Molekül) umfaßt. Hierbei gilt das oben bezüglich Vektoren bereits beschriebene.

Gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, wobei RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotyl-Zellen, isoliert wird, mit der nach Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird. Die einzelnen Schritte dieses Verfahrens werden nach Protokollen wie an sich bekannt durchgeführt. Für die reverse Transkription besteht einerseits die Möglichkeit, mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern die cDNA der gesamten mRNA herzustellen und erst anschließend mit ausgewählten Primern eine PCR durchzuführen, um DNA-Moleküle umfassend das GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Gen herzustellen. Andererseits können die ausgewählten Primer direkt für die reverse Transkription eingesetzt werden, um eine kurze, spezifische cDNA zu erhalten. Die geeigneten Primer können z.B. synthetisch nach Vorlage von cDNA-Sequenzen der Transferase hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, daß das erfindungsgemäße DNA-Molekül in einen Vektor kloniert wird, der anschließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt



Es gibt zahlreiche bekannte, effiziente Transfektionsmechanismen für verschiedene Wirtssysteme. Einige Beispiele sind Elektroporation, die Calciumphosphatmethode, Mikroinjektion, Liposomenmethode.

Die transfektierten Zellen werden anschließend selektiert, z.B. aufgrund von Antibiotika-Resistenzen, für die der Vektor Gene aufweist, oder anderer Markergene. Danach werden die transfektierten Zelllinien amplifiziert, entweder in kleineren Mengen, z.B. in Petrischalen, oder in großen Mengen, etwa in Fermentoren. Weiters weisen Pflanzen eine besondere Eigenschaft auf, sie sind nämlich in der Lage sich aus einer (transfektierten) Zelle bzw. aus einem Protoplasten zu einer vollständigen Pflanze wieder zu entwickeln, die gezüchtet werden kann.

Je nach eingesetztem Vektor kommt es zu Vorgängen im Wirt, so daß die Enzym-Expression unterdrückt oder vollständig unterbunden wird:

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül mit der Deletions-Insertions- oder Substitutionsmutation transfektiert, so kommt es zu einer homologen Rekombination : Das mutierte DNA-Molekül erkennt trotz Mutation die identische Sequenz im Genom der Wirtszelle und wird an genau der Stelle eingebaut, so daß ein "Knockout-Gen" entsteht. Auf diese Weise wird in das Gen für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase eine Mutation eingebracht, die die einwandfreie Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase inhibieren kann. Wie oben schon dargelegt ist es bei dieser Technik wichtig, daß die Mutation ausreicht, um die Expression des aktiven Proteins zu unterbinden. Nach Selektion und Amplifikation kann als zusätzliche Überprüfung das Gen sequenziert werden, um den Erfolg der homologen Rekombination bzw. den Grad der Mutation festzustellen.

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, transfektiert, so wird in der Wirtszelle das aktive Ribozym exprimiert. Das Ribozym komplexiert die komplementäre mRNA Sequenz der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zumindest an einer bestimmten Stelle, schneidet diese Stelle und kann auf diese Weise die Translation des Enzyms inhibieren. In dieser Wirtszelle sowie in den von ihr abstammenden Zelllinien bzw. gegebenenfalls Pflanze wird keine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimiert.

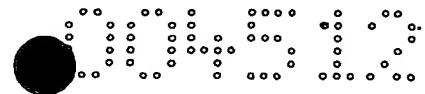
1997, Plant J.; 11(6):1195-1206). Dieses Verfahren funktioniert demnach nicht mit einem Vektor, sondern mit einem reinen DNA-Molekül. Das DNA-Molekül wird z.B. durch Genbombardement, Mikroinjektion oder Elektroporation, um nur drei Beispiele zu nennen, in den Wirt eingeschleust. Wie oben bereits dargelegt, legt sich das DNA-Molekül an die homologe Sequenz im Genom des Wirten an, so daß es zu einer homologen Rekombination und damit zur Aufnahme der Deletions-, Insertions- bzw. Substitutionsmutation im Genom kommt: Die Exprimierung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kann unterdrückt bzw. vollständig unterbunden werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie Insekten bzw. Insektenzellen, wobei ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in natürlichen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen und Insekten bzw. Insektenzellen vorkommende GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität beträgt. Der Vorteil dieser Pflanzen bzw. Pflanzenzellen liegt darin, daß die Glykoproteine, die von ihnen produziert werden, keine bzw. kaum α 1,3-gebundene Fucose aufweisen. Werden nun Produkte dieser Pflanzen bzw. Insekten vom menschlichen oder Wirbeltier-Körper aufgenommen, kommt es zu keiner Immunreaktion gegen das α 1,3-Fucose-Epitop.

Vorzugsweise werden rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen zur Verfügung gestellt, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und daß ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

Die Erfindung betrifft ebenfalls rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und daß ihre GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist. Auch hier werden keine Glykoproteine mit α 1,3-gebundenen Fucoseresten produziert, so daß es ebenfalls zu keiner Immunreaktion gegen das α 1,3-Fucose-Epitop kommt.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein PNA-Molekül, das eine Basensequenz umfaßt, die komplementär zur Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls sowie Teilsequenzen davon ist. PNA (Peptid Nukleinsäure) ist eine DNA ähnliche Sequenz, wobei



Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, transfektiert sind, so daß die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Dabei werden wie oben schon beschriebene Vektoren umfassend Gene für die gewünschten Proteine in den Wirt bzw. Wirtszellen wie ebenfalls oben schon beschrieben transfektiert. Die transfektierten Pflanzen- oder Insektenzellen exprimieren die gewünschten Proteine, wobei sie keine oder kaum α 1,3-gebundene Fucose aufweisen. Dadurch lösen sie die oben bereits erwähnten Immunreaktionen im menschlichen oder Wirbeltier-Körper nicht aus. Es können jegliche Proteine in diesen Systemen produziert werden.

Vorzugsweise wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, transfektiert sind, so daß die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Durch dieses Verfahren wird es möglich, menschliche Proteine in Pflanzen(zellen) zu produzieren, die, wenn sie durch den menschlichen Körper aufgenommen sind, keine gegen α 1,3-gebundene Fucosereste gerichtete Immunreaktion auslösen. Dabei besteht die Möglichkeit, Pflanzensorten zur Produktion der rekombinanten Glykoproteine einzusetzen, die als Nahrungsmittel dienen, z.B. Banane, Kartoffel und/oder Tomate. Die Gewebe dieser Pflanze umfassen das rekombinante Glykoprotein, so daß z.B. durch Extraktion des rekombinanten Glykoproteins aus dem Gewebe und anschließende Verabreichung bzw. direkt durch den Verzehr des pflanzlichen Gewebes das rekombinante Glykoprotein in den menschlichen Körper aufgenommen wird.

Bevorzugterweise ist dabei ein Verfahren zur Herstellung von

reaktion im menschlichen Körper ausgelöst, da, wie in der Beschreibungseinleitung schon dargestellt, die $\alpha 1,3$ -gebundenen Fucose-Reste die Hauptursache der Immunreaktionen bzw. Kreuz-Immunreaktionen gegen pflanzliche und Insekten-Glykoproteine sind.

Ein weiterer Aspekt umfaßt eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Glykoproteine umfaßt. Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Glykoproteinen umfaßt die pharmazeutische Zusammensetzung weitere, für solche Zusammensetzungen übliche Zusätze. Dies sind z.B. geeignete Verdünnungsmittel verschiedenen Puffergehalts (z.B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), pH und Ionenstärke, Additive, wie etwa Tenside und Löslichmacher (z.B. Tween 80, Polysorbate 80), Konservierungsmittel (z.B. Thimerosal, Benzylalkohol), Adjuvantien, Antioxidationsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Natriummetabisulfit), Emulgatoren, Füllstoffe (z.B. Lactose, Mannitol), kovalente Bindung von Polymeren, wie etwa Polyethylenglykol, an das Protein, Einbau des Materials in teilchenförmige Zubereitungen von polymeren Verbindungen, wie etwa Polymilchsäure, Polyglykolsäure, etc oder in Liposome, Hilfsstoffe und/oder Trägerstoffe, die bei der jeweiligen Behandlung nützlich sind. Solche Zusammensetzungen werden den physikalischen Zustand, die Stabilität, die Geschwindigkeit der in-vivo Freisetzung und die Geschwindigkeit der in-vivo Ausscheidung der erfindungsgemäßen Glykoproteine beeinflussen.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen zur Verfügung, die für eine GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, wobei die erfindungsgemäßen, markierten DNA-Moleküle zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase codieren, binden. Die hybridisierten DNA-Moleküle können detektiert, quantifiziert und selektiert werden. Damit die Probe Einzelstrang-DNA aufweist, mit der die markierten DNA-Moleküle hybridisieren können, wird die Probe, z.B. durch Erwärmen, denaturiert.

Eine Möglichkeit besteht darin, die zu untersuchende DNA, eventuell nach Zusetzen von Endonukleasen, durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel zu trennen. Nach Überführen auf eine Membran aus Nitrozellulose werden die erfindungsgemäßen mar-

Die Haupt-Isoform des Enzyms weist ein apparentes Molekulargewicht von 54 kDa auf.

Die Erfindung betrifft ebenso ein Verfahren zur Herstellung von "verpflanzlichten" Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, wobei zu einer Probe umfassend eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase sowie Fucose-Einheiten zugesetzt werden, so daß Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Klonierung von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase ist es möglich, große Mengen gereinigtes Enzym herzustellen. Um eine voll aktive Transferase zu erhalten, werden geeignete Reaktionsbedingungen hergestellt. Es hat sich gezeigt, daß die Transferase eine besonders hohe Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 7 aufweist, wenn als Puffer 2- (N-Morpholino)Ethansulfonsäure-HCL verwendet wird. In Gegenwart von bivalenten Kationen, insbesondere Mn^{2+} , wird die Aktivität der rekombinanten Transferase verstärkt. Die Kohlenhydrat-Einheit wird entweder in ungebundener Form oder an ein Protein gebunden zur Probe zugesetzt. Die rekombinante Transferase ist für beide Formen aktiv.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, weiter erläutert werden. Im einzelnen zeigen in der Zeichnung die Fig. 1a und 1b die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven; die Fig. 2 die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAC- α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 3 das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung und die gemessene Transferase-Aktivität der einzelnen Isoformen; die Fig. 4 die N-terminalen Sequenzen von 4 tryptischen Peptiden 1 - 4 sowie die DNA-Sequenz von drei Primern S1, A2 und A3; die Fig.

Schritt 4: Die dialysierte Probe wurde auf eine mit Puffer C kalibrierte GnGn-Sephrose-Säule aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit Puffer C umfassend 1 M NaCl anstelle von MnCl_2 eluiert.

Schritt 5: Das Enzym wurde anschließend gegen Puffer D dialysiert und auf eine GDP-Hexanolamin-Sephrose-Säule aufgebracht. Nach Waschen der Säule mit Puffer D wurde die Transferrase durch Ersetzen von MgCl_2 und NaCl mit 0.5 mM GDP eluiert. Aktive Fraktionen wurden gepoolt, gegen 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3, dialysiert und lyophilisiert.

Die enzymatische Aktivität der GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase wurde durch Verwendung von GnGn-Peptid und GDP-L-[U- ^{14}C] Fucose bei Substratkonzentrationen von jeweils 0.5 und 0.25, in Gegenwart von 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCl Puffer, Triton X-100, MnCl_2 , GlcNAc und AMP bestimmt (gemäß Staudacher et al. 1998 Glycoconjugate J. 15, 355-360; Staudacher et al. 1991 Eur.J.Biochem. 199, 745-751).

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bichinchoninsäure Methode (Pierce) oder, bei den letzten Schritten der Enzymreinigung, mittels Aminosäurenanalyse bestimmt (Altmann 1992 Anal.Biochem. 204, 215-219).

In Fig 1a und 1b sind die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven dargestellt. Fig. 1a zeigt die oben beschriebene Trennung auf der S-Sephrose Säule, Fig. 1 b die Trennung auf der GnGn-Sephrose-Säule, wobei der Kreis Protein, der schwarze, volle Kreis GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase und das Viereck N-Acetyl- β -Glucosaminidase darstellt. Ein U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μmol Fucose auf einen Akzeptor pro Minute transferiert.

Tabelle 1 zeigt die einzelnen Schritte der Transferase-Reinigung.

Puffer D.

5 mM MnCl_2 und

0.02% NaN_3

10 mM $MgCl_2$,

0.1 M NaCl und

0.02% NaN_3

SDS-Page und isoelektrische Fokussierung

Fig. 2 stellt die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase dar, wobei links die zweidimensionale Elektrophorese und rechts die eindimensionale SDS-Page dargestellt sind. Dabei ist die mit A bezeichnete Bahn ein Standard, die mit B bezeichnete Bahn die GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase aus der GnGn-Sepharose-Säule und die mit C bezeichnete Bahn "gereinigte" GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, d.h. die Fraktion der GDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule. Die zwei Banden bei 54 und 56 kDa stellen Isoformen der Transferase dar.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung. Bahn A wurde mit Silber gefärbt, auf Bahn B wurde Aktivität der Transferase Isoformen getestet. Die Aktivität ist dabei als % Fucose angegeben, die von GDP-Fucose auf das Substrat transferiert wurde.

wurden 40 Zyklen von 1 min bei 95°C, 1 min bei 49°C und 2 min bei 72°C durchlaufen. Der letzte Extensionsschritt wurde bei 72°C für 8 min durchgeführt. PCR Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert, wobei das TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet wurde, und sequenziert. Die Produkte dieser PCR waren zwei DNA-Fragmente mit der Länge von 744bp und 780bp, wobei beide DNA-Fragmente dasselbe 5'-Ende aufweisen (s. auch Fig.7).

Ausgehend von diesen zwei DNA-Fragmenten wurden die fehlenden 5' und 3' Regionen der cDNA durch 5'- und 3'- Rapid Amplifikation von cDNA-Enden (RACE) erhalten, wobei der RACE Kit von Gibco-BRL verwendet wurde. Als Antisense-Primer wurde der universelle Amplifikations-Primer des Kits und als Sense-Primer entweder 5'-CTGGAAGTGTCCCTGTGGTT-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 12) oder 5'-AGTGCAGTAGAGGCCAGAA-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 13) verwendet. Es wurde auch als Sense Primer der verkürzte Anker-Primer des Kits und als Antisense-Primer 5'-TTCGAGCACCACAATTGGAAAT-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 14) oder 5'-GAATGCAAAGACGGCAGCATGAAT-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 15) verwendet.

Die PCR wurde mit einer Annealing Temperatur von 55°C und den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die 5' und 3' RACE Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert und sequenziert: Die Sequenzen der subklonierten Fragmente wurden mittels der Didesoxynukleotid-Methode sequenziert (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit und ABI PRISM 310 Genetic analyser (Perkin Elmer)). T7 und M13 Vorwärts-Primer wurden für die Sequenzierung der in den pCR2.1 Vektor klonierten Produkte verwendet. Beide Stränge der Codierungsregion wurden vom Vienna VBC Genomics-Sequencing Service sequenziert, wobei infrarotmarkierte Primer (IRD700 und IRD800) und ein LI-COR Long Read IR 4200 Sequenzierer (Lincoln, NE) verwendet wurden.

Fig. 5a und 5b zeigen die gesamte cDNA, die eine Größe von 2198 bp und einen offenen Leserahmen von 1530 bp aufweist (Sequenz-Identifikationsnummer 1). Der offene Leserahmen (Startcodon bei Basenpaaren 211-213, Stopcodon bei Basenpaar 1740-1743) codiert für ein Protein von 510 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56.8 kDA und einem theoretischen pI-Wert von 7.51.

Fig. 6a und 6b zeigen die von der cDNA hergeleitete Aminosäuresequenz der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase (Sequenz Iden-

cosyltransferase samt cytoplasmatischer und transmembraner Region wurde mit dem Vorwärts-Primer 5'-cggcggatcCGCAATTGAATGATG-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 16) und Rückwärts-Primer 5'-ccggctgcaGTACCATTTAGCGCAT-3' (Sequenz-Identifikationsnummer 17) mit dem Expand High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit PstI und BamHI doppelt verdaut und in Alkalin-Phosphatase behandeltem Baculovirus Transfer-Vektor pVL1393, der zuvor mit PstI und BamHI verdaut wurde, subkloniert. Um eine homologe Rekombination zu gewährleisten, wurde der Transfervektor mit Baculo Gold viraler DNA (PharMingen, San Diego, CA) in Sf9 Insektenzellen in IPL-41 Medium mit Lipofectin cotransfiziert. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 27°C wurden verschiedene Volumina des Überstandes mit dem rekombinanten Virus zur Infektion der Sf21 Insektenzellen verwendet. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 27°C in IPL-41 Medium mit 5% FCS wurden die Sf1 Zellen geerntet und 2x mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 25-mM Tris HCL Puffer, pH 7.4, mit 2% Triton X-100 resuspendiert und durch Sonifikation auf Eis aufgebrochen.

Beispiel 6:

Assay für die GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase-Aktivität

Das Homogenat und der Zellüberstand wurden auf GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase getestet. Blindproben wurden mit rekombinatem Baculovirus, der für die Tabak-GlcNAc-Transferase I (Strasser et al. 1999, Glycobiology, im Druck) codiert, durchgeführt.

Fig. 9 zeigt die gemessene Enzymaktivität der rekombinanten GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase sowie der Negativkontrolle. Im besten Fall war die Enzymaktivität der cotransfizierten Zellen und deren Überstand 30x höher als die der Negativkontrollen. Diese endogene Aktivität, die in Abwesenheit der rekombinanten Transferase meßbar ist, kommt im wesentlichen von der Insekten- α 1,6-Fucosyltransferase und nur zu einem geringen Prozentsatz von der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase. Demnach beträgt die Erhöhung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die von den rekombinanten Baculoviren stammt, weit über das 100fache.

Das Enzym zeigte eine breite Maximal-Aktivität um einen pH-

cosyltransferase notwendig zu sein. Die rekombinante Transferase war weiters inaktiv hinsichtlich die gebräuchlichen Akzeptoren, die für die Bestimmung der Blutgruppen $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen, die die Fucose auf GlcNAc an den nicht reduzierenden Enden von Oligosacchariden transferiert. Die scheinbaren K_m -Werte für die Akzeptor-Substrate GnGn-Peptid, GnGnF⁶-Peptid, M5Gn-Asn und für das Donor Substrat GDP-Fucose wurden auf 0.19, 0.13, 0.23 bzw. 0.11 geschätzt. Die Strukturen der Moleküle sind in Fig. 10a und 10b dargestellt.

Tabelle 3

Akzeptor-Substrat	rel. Aktivität	K_m -Wert
	%	mM
GnGn-Peptid	100	0.19
GnGnF ⁶ -Peptid	87	0.13
M5Gn-Asn	71	0.23
MM-Peptid	0	
Gal β 1-4GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0	

Beispiel 7:

Massenspektrometrie des Fucosyl-Transferase Produkts

Dabsyliertes GnGn-Hexapeptid (2nmol) wurde mit dem Insektenzellen-Homogenat umfassend die rekombinante GlcNAc- $\alpha 1,3$ Fucosyltransferase (0.08 mU) in Gegenwart von nicht radioaktiver GDP-L-Fucose (10 nmol), 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCL



AAGTCGTGTT CGGTTGGATG TAAATTTGGG TTTAGTGGGG ATAGAAAGCC AGATGCCGCA	660
TTTGGGTTAC CTCAACCAAG TGGAACAGCT AGCATTCTGC GATCAATGGA ATCAGCAGAA	720
TACTATGCTG AGAACAATAT TGCCATGGCA AGACGGAGGG GATATAACAT CGTAATGACA	780
ACCAGTCTAT CTTCGGATGT TCCTGTTGGA TATTTTTCAT GGGCTGAGTA TGATATGATG	840
GCACCAGTGC AGCCGAAAAC TGAAGCTGCT CTTGCAGCTG CTTTCATTTC CAATTGTGGT	900
GCTCGAAATT TCCGGTTGCA AGCTCTTGAG GCCCTTGAAA AATCAAACAT CAAAATTGAT	960
TCTTATGGTG GTTGTCACAG GAACCGTGAT GGAAGAGTGA ACAAAGTGGA AGCCCTGAAG	1020
CACTACAAAT TTAGCTTAGC GTTTGAAAAT TCGAATGAGG AAGATTATGT AACTGAAAAA	1080
TTCTTCCAAT CCCTTGTTGC TGGAAGCTGC CCTGTGGTTG TTGGTGCTCC AAATATTCAG	1140
GACTTTGCTC CTTCTCCTGG TTCAATTTTA CATATTAAAG AGATAGAGGA TGTGAGTCT	1200
TTGCAAAGA CCATGAGATA TCTAGCAGAA AATCCCGAAG CATATAATCA ATCATTGAGG	1260
TGGAAGTATG AGGGTCCATC TGACTCCTTC AAGGCCCTTG TGGATATGGC AGCTGTGCAT	1320
TCATCGTGCC GTCTTTGCAT TCACTTGGCC ACAGTGAGTA GAGAGAAGGA AGAAAATAAT	1380
CCAAGCCTTA AGAGACGTCC TTGCAAGTGC ACTAGAGGGC CAGAAACCGT ATATCATATC	1440
TATGTCAGAG AAAGGGGAAG GTTTGAGATG GAGTCCATTT ACCTGAGGTC TAGCAATTTA	1500
ACTCTGAATG CTGTGAAGGC TGCTGTTGTT TTGAAGTTCA CATCCCTGAA TCTTGTGCCT	1560
GTATGGAAGA CTGAAAGGCC TGAAGTTATA AGAGGGGGGA GTGCTTTAAA ACTCTACAAA	1620
ATATACCCAA TTGGCTTGAC ACAGAGACAA GCTCTTTATA CCTTCAGCTT CAAAGGTGAT	1680
GCTGATTTCA GGAGTCACTT GGAGAACAAT CCTTGTGCCA AGTTTGAAGT CATTTTTGTG	1740
TAGCATGCGC TAAATGGTAC CTCTGCTCTA CCTGAATTAG CTTCACTTAG CTGAGCACTA	1800
CTAGAGTTT TAGGAATGAG TATGGCAGTG AATATGGCAT GGCTTTATTT ATGCCTAGTT	1860
TCTTGGCCAA CTCATTGATG TTTTGTATAA GACATCACAC TTTAATTTTA AACTTGTTTC	1920
TGTAGAAGTG CAAATCCATA TTTAATGCTT AGTTTTAGTG CTCTTATCTG ATCATCTAGA	1980
AGTCACAGTT CTTGTATATT GTGAGTGAAA ACTGAAATCT AATAGAAGGA TCAGATGTTT	2040
CACTCAAGAC ACATTATTAC TTCATGTTGT TTTGATGATC TCGAGCTTTT TTAGTGTCTG	2100
GAAGTGTCCC TGTGGTTTGA GCACCTGTTA TTGCTTCAGT GTTACTGTCC AGTGGTTATC	2160
GTTTTTGACC TCTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2198

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 510 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

00510

Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val
290 295 300

Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu
305 310 315 320

His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg
325 330 335

Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys
340 345 350

Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala
355 360 365

Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg
370 375 380

Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys
385 390 395 400

Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly
405 410 415

Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu
420 425 430

Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
435 440 445

Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
450 455 460

Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
465 470 475 480

Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
485 490 495

Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
500 505 510

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 105 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAAGCCCTGA AGCACTACAA ATTTAGCTTA GCGTTTGAAA ATTCGAATGA GGAAGATTAT 60

GTAAGTGAAG AATTCTTCCA ATCCCTTGTT GCTGGAACTG TCCCT 105

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

004512

- (B) ART: Aminos„ure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŠLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn Ile Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÖNGE: 10 Aminos„uren
 - (B) ART: Aminos„ure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŠLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÖNGE: 29 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŠLS: Sonstige Nucleins„ure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(vi) URSPRÖNLICHE HERKUNFT:
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

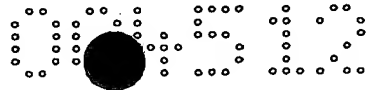
GCNGARTAYT AYGCNGARAA YAAAYATHGC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÖNGE: 22 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŠLS: Sonstige Nucleins„ure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"



(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŰLS: Sonstige Nucleins„ure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TTCGAGCACC ACAATTGGAA AT

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŰLS: Sonstige Nucleins„ure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GAATGCAAAG ACGGCACGAT GAAT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŰLS: Sonstige Nucleins„ure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CGGCGGATCC GCAATTGAAT GATG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÖNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKŰLS: Sonstige Nucleins„ure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"



Patentansprüche:

1. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfaßt oder zumindest 50% Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfaßt, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.
2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, codiert.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 aufweist.
4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare umfaßt.
5. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 3 umfaßt oder eine Sequenz umfaßt, die zumindest 85%, insbesondere zumindest 95%, Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist.
6. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Teilsequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfaßt und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist.
7. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.
8. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon umfaßt.

17. Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, daß ihre GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in natürlichen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen und Insekten bzw. Insektenzellen vorkommende GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität beträgt.
18. Rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und daß ihre GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.
19. Rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und daß ihre GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.
20. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Basensequenz umfaßt, die komplementär zur Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon ist.
21. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Basensequenz umfaßt, die der Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon entspricht.
22. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß PNA-Moleküle gemäß Anspruch 20 oder 21 in die Zellen eingeschleust werden.
23. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß das System nach einem der Ansprüche 17 bis 19 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 22 hergestellt sind, transfektiert ist (sind), so daß die rekombinanten Glykoproteine expri-miert werden.
24. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß das System nach einem der Ansprüche 17 bis 19 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 22 hergestellt sind, transfektiert ist (sind), so daß die rekombinanten Glykoproteine expri-miert werden.
25. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glyko-

33. Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 kloniert wurde, dadurch gekennzeichnet, daß sie Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.0 und 9.0, insbesondere zwischen 6.8 und 8.2, aufweist.
34. Präparation nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 aufweist.
35. Verfahren zur Herstellung von verpflanzlichten Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß zu einer Probe umfassend eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase sowie Fucose-Einheiten zugesetzt werden, so daß Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird.

DA/KPP

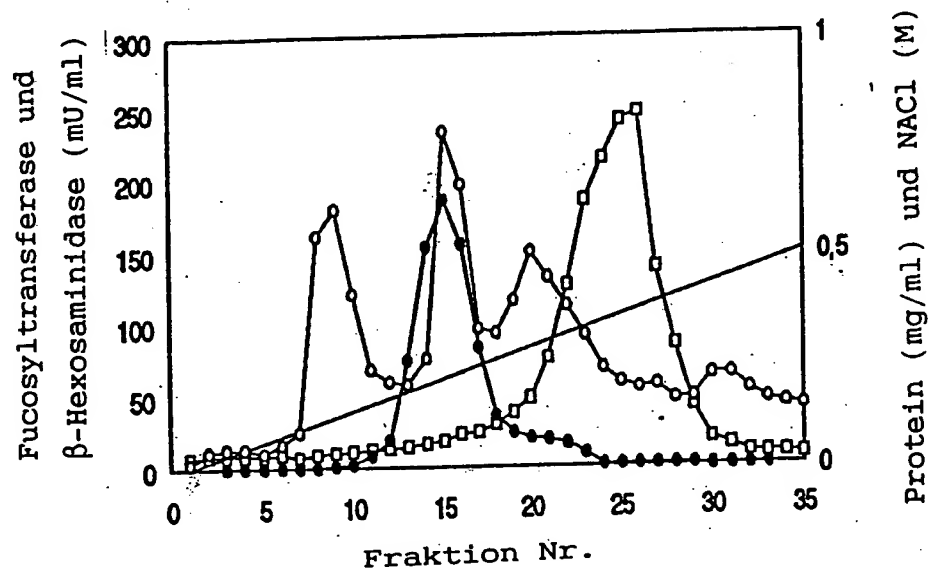


FIG.1 a

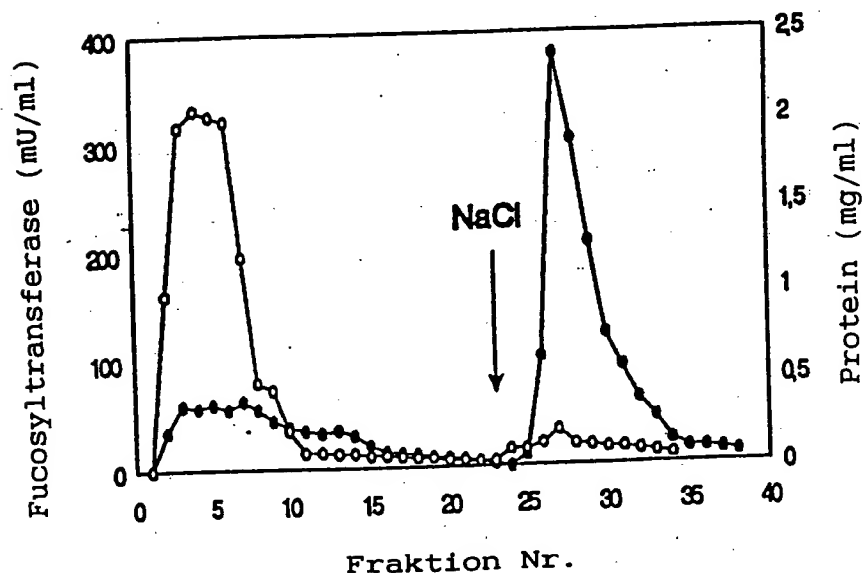
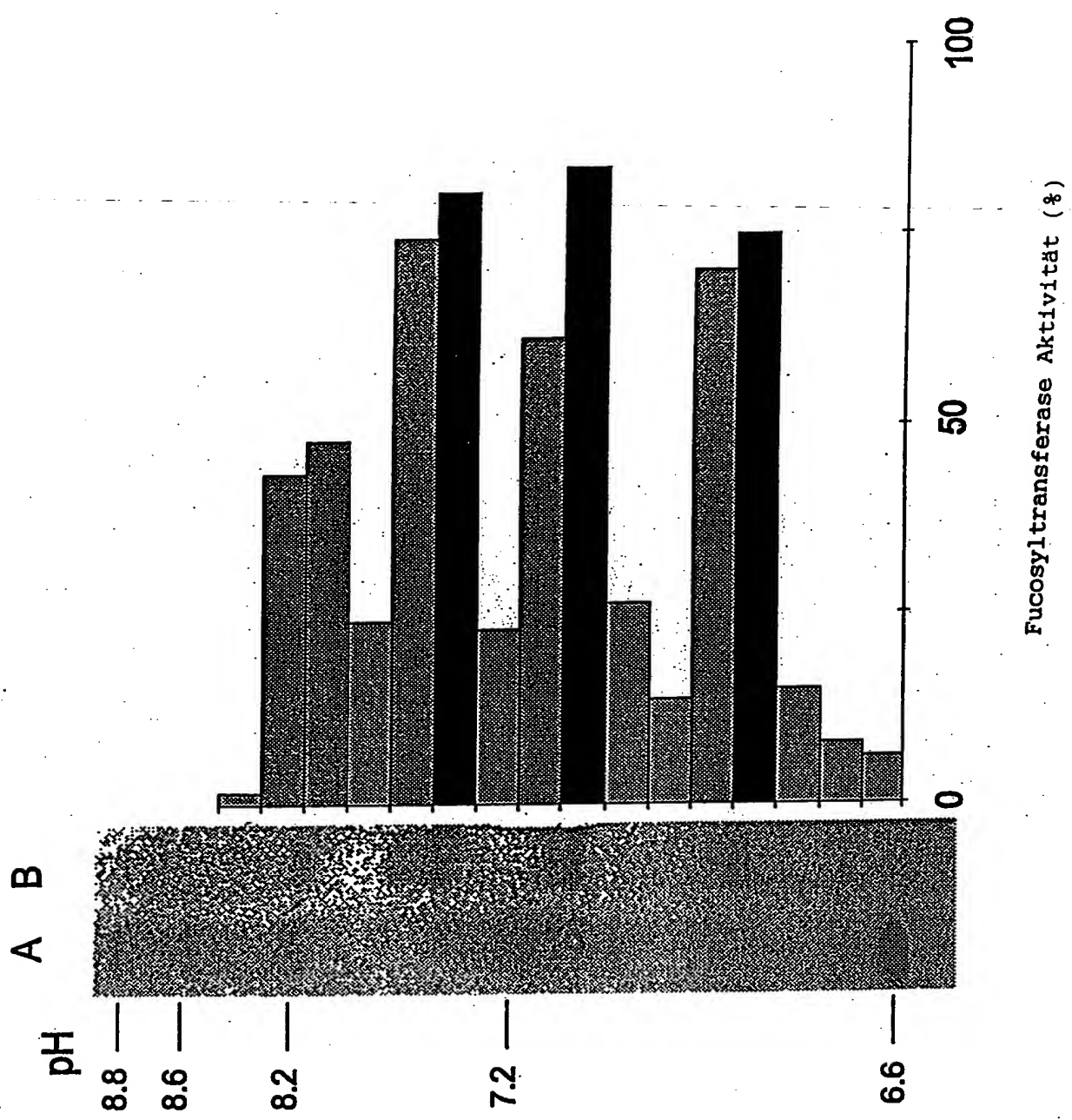


FIG.1 b

FIG.3



ACTAACTCAA ACGCTGCATT TTCTTTTTTC TTTCAGGGAA CCATCCACCC ATAACAACAA 60
AAAAACAAC AGCAAGCTGT GTTTTTTTTA TCGTTCTTTT TCTTTAAACA AGCACCCCCA 120
TCATGGAATC GTGCTCATAA CGCCAAAATT TTCCATTTC CTTTGATTTT TAGTTTATTT 180
TGCGGAATTG GCAGTTGGGG GCGCAATTGA ATGATGGGTC TGGTGACGAA TCTTCGAGGC 240
TCGAGAACAG ATGGTGCCCA ACAAGACAGC TTACCCGTTT TGGCTCCGGG AGGCAACCCA 300
AAGAGGAAAT GGAGCAATCT AATGCCTCTT GTTGTTGCC TGTGCGTCAT CGCGGAGATC 360
GCGTTTCTGG GTAGGTTGGA TATGGCCAAA AACGCCGCCA TGGTTGACTC CCTCGCTGAC 420
TTCTTCTACC GCTCTCGAGC GGTCGTTGAA GGTGACGATT TGGGGTTGGG TTTGGTGGCT 480
TCTGATCGGA ATTCTGAATC GTATAGTTGT GAGGAATGGT TGGAGAGGGA GGATGCTGTC 540
ACGTATTGCG GGGGCTTTTC CAAAGAGCCT ATTTTGTGTT CTGGAGCTGA TCAGGAGTGG 600
AAGTCGTGTT CGGTTGGATG TAAATTTGGG TTTAGTGGGG ATAGAAAGCC AGATGCCGCA 660
TTTGGGTTAC CTCAACCAAG TGGAACAGCT AGCATTCTGC GATCAATGGA ATCAGCAGAA 720
TACTATGCTG AGAACAATAT TGCCATGGCA AGACGGAGGG GATATAACAT CGTAATGACA 780
ACCAGTCTAT CTTCGGATGT TCCTGTTGGA TATTTTTCAT GGGCTGAGTA TGATATGATG 840
GCACCAGTGC AGCCGAAAAC TGAAGCTGCT CTTGCAGCTG CTTTCATTTT CAATTGTGGT 900
GCTCGAAATT TCCGGTTGCA AGCTCTTGAG GCCCTTGAAA AATCAAACAT CAAAATTGAT 960
TCTTATGGTG GTTGTCACAG GAACCGTGAT GGAAGAGTGA ACAAAGTGGA AGCCCTGAAG 1020
CACTACAAAT TTAGCTTAGC GTTTGAAAAT TCGAATGAGG AAGATTATGT AACTGAAAAA 1080
TTCTTCCAAT CCCTTGTGTC TGGAACGTGC CCTGTGGTTG TTGGTGCTCC AAATATTCAG 1140

FIG.5 a

A 270/99-000510

Urtext

Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Arg Gly Ser Arg Thr Asp Gly Ala
1 5 10 15
Gln Gln Asp Ser Leu Pro Val Leu Ala Pro Gly Gly Asn Pro Lys Arg
20 25 30
Lys Trp Ser Asn Leu Met Pro Leu Val Val Ala Leu Val Val Ile Ala
35 40 45
Glu Ile Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Met Ala Lys Asn Ala Ala Met
50 55 60
Val Asp Ser Leu Ala Asp Phe Phe Tyr Arg Ser Arg Ala Val Val Glu
65 70 75 80
Gly Asp Asp Leu Gly Leu Gly Leu Val Ala Ser Asp Arg Asn Ser Glu
85 90 95
Ser Tyr Ser Cys Glu Glu Trp Leu Glu Arg Glu Asp Ala Val Thr Tyr
100 105 110
Ser Arg Gly Phe Ser Lys Glu Pro Ile Phe Val Ser Gly Ala Asp Gln
115 120 125
Glu Trp Lys Ser Cys Ser Val Gly Cys Lys Phe Gly Phe Ser Gly Asp
130 135 140
Arg Lys Pro Asp Ala Ala Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Gly Thr Ala
145 150 155 160
Ser Ile Leu Arg Ser Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn
165 170 175
Ile Ala Met Ala Arg Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser
180 185 190
Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp
195 200 205
Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala
210 215 220
Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu
225 230 235 240
Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His

FIG.6 a

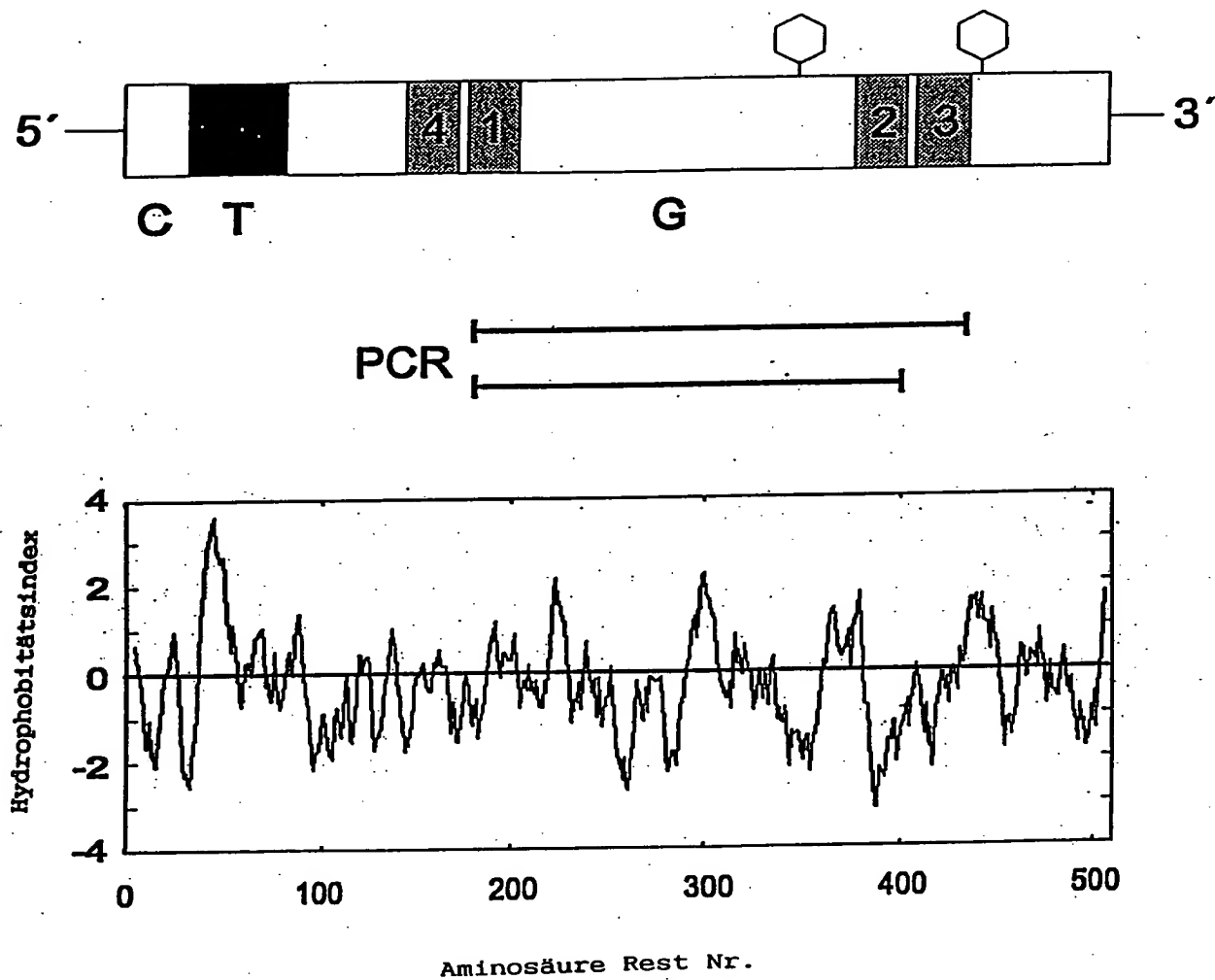


FIG.7

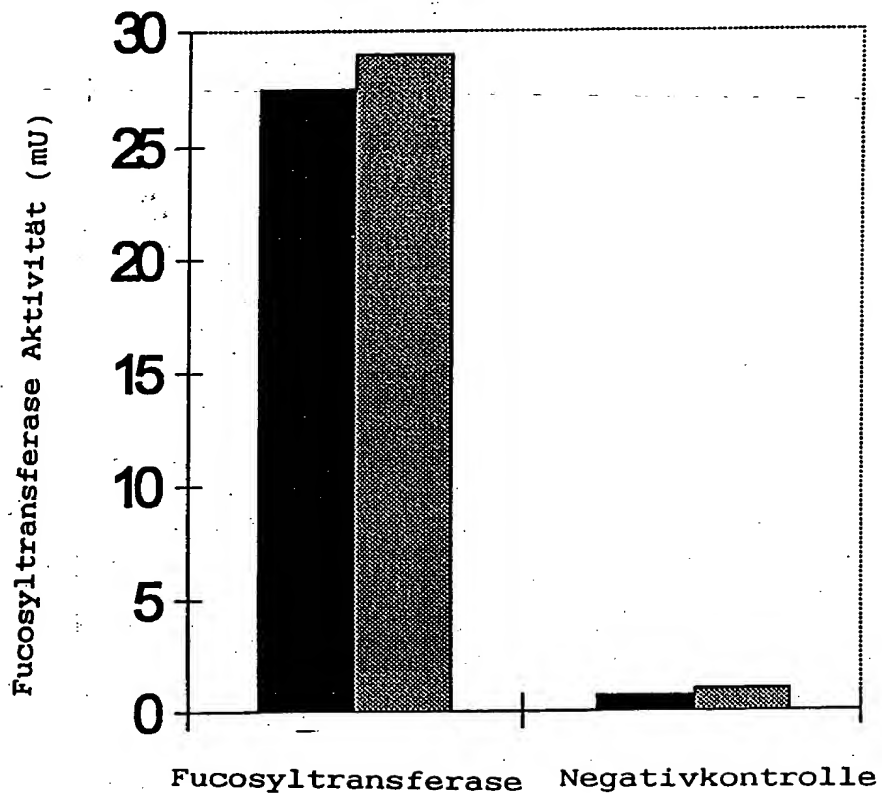


FIG.9

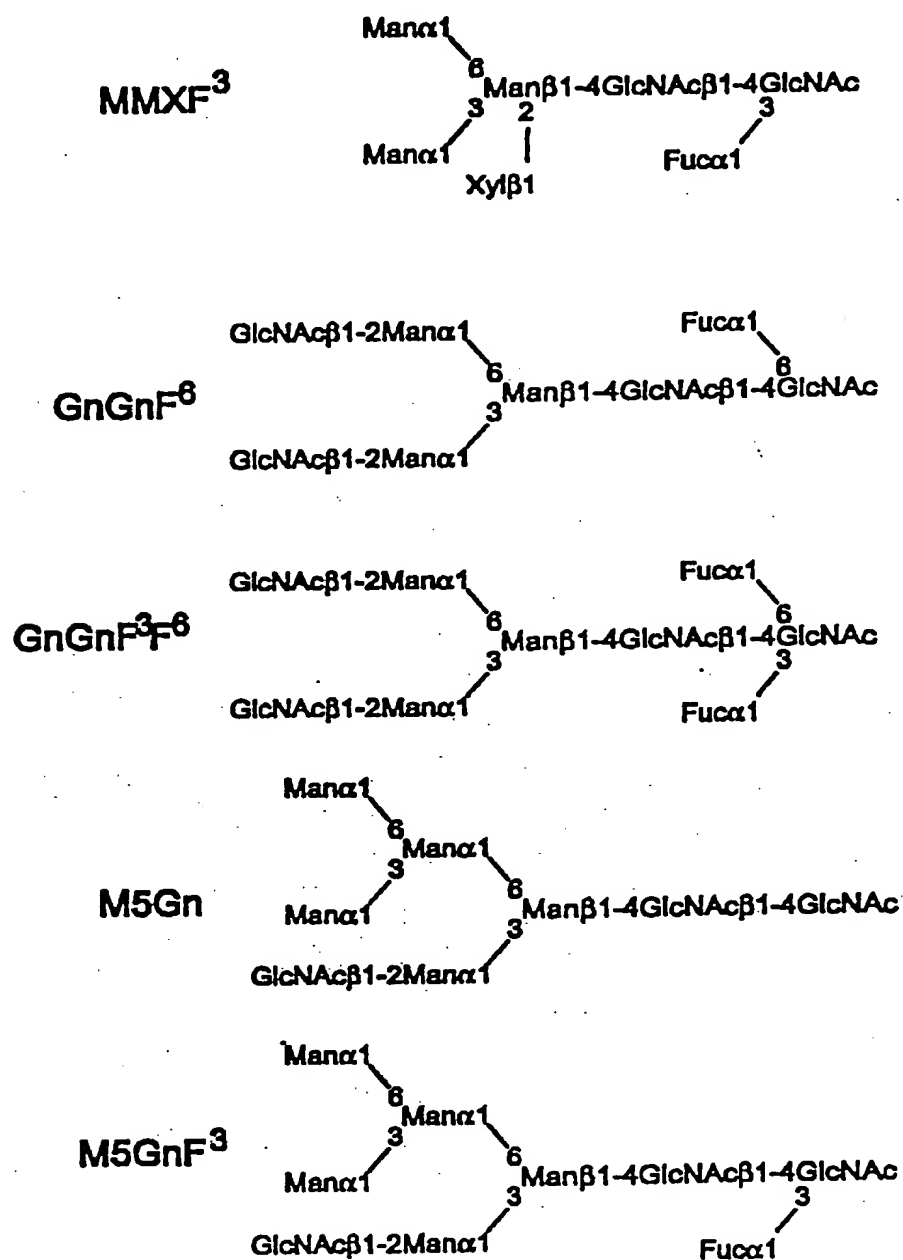
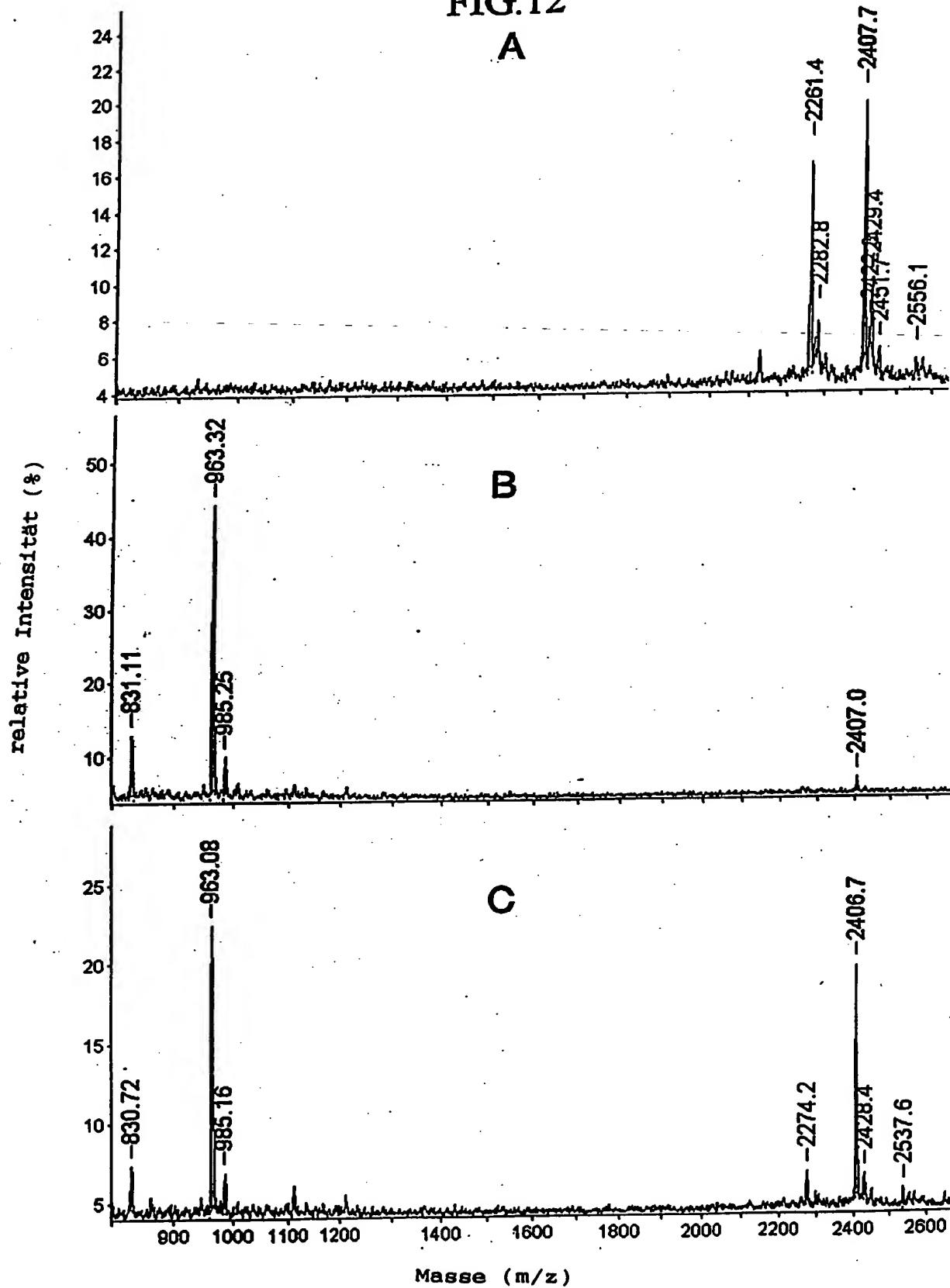


FIG.10 b

A 270/99-1 004510

Ortext

FIG.12





41 0 1 2